

Les sérine-estérases du système de la coagulation

Citation for published version (APA):

Hemker, H. C., & de Graaf, J. S. (1973). Les sérine-estérases du système de la coagulation. *Pathologie Biologie*, 21(Supplement), 5-10.

Document status and date:

Published: 01/11/1973

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

LES SÉRINE-ESTÉRASES DU SYSTÈME DE LA COAGULATION

H. C. HEMKER et J. S. de GRAAF

*Laboratoire de Cardiobiochimie et de Biochimie de la Coagulation Sanguine,
Hôpital Universitaire, Leyden (Pays-Bas)*

RÉSUMÉ. — Les agents capables d'estérifier un résidu sérine actif permettent d'individualiser au moins quatre sérine-estérases parmi les facteurs de la coagulation : les facteurs II (prothrombine), VII, IX et X. La haute spécificité de ces protéases ne peut être expliquée par leur seule structure moléculaire. Pour reconnaître leur substrat elles doivent être associées à d'autres molécules qui leur fournissent des sites d'attachement supplémentaires. Ainsi le facteur X activé (Xa) est-il associé dans la prothrombinase à une micelle phospholipidique et au facteur V ; l'ion calcium fixe le Xa sur des sites chargés du phospholipide auquel le V est lié par interactions hydrophobes. La fixation du substrat lui-même, la prothrombine, à la micelle phospholipidique accroît encore la spécificité de la réaction enzymatique.

De nombreux arguments laissent penser que l'activateur du X est un complexe homologue associant IXa, calcium, VIII et phospholipides.

Peu de choses sont encore connues sur la nature enzymatique du facteur tissulaire et du produit de contact formé par l'interaction des facteurs XII et XI en présence d'une surface mouillable.

Pour rendre compte de l'équilibre délicat permettant l'hémostase sans thrombose extensive, la cinétique enzymatique propose le modèle d'une « explosion limitée » faisant intervenir l'action auto-catalytique de certains produits générés pendant la coagulation et le rôle des inhibiteurs.

Mots-clés : Facteurs de coagulation. — Prothrombinase. — Sérine-estérases. — Cinétique enzymatique.

HEMKER H. C., GRAAF J. S. de, 1973. — Les sérine-estérases du système de la coagulation. *Path.-Biol.*, 21, Suppl., 5-10.

Le mécanisme de la coagulation doit être à la fois d'une extrême efficacité et respecter un équilibre très subtil. Il est indispensable que toute effraction vasculaire entraîne une génération locale de thrombine ; mais il est également impératif que nul thrombus ne se forme dans les vaisseaux intacts. Les déviations de ce mécanisme constituent (à cause de leurs conséquences mortelles) un des premiers soucis du médecin. Pour le biochimiste il est remarquable qu'un mécanisme d'une telle efficacité ne tombe en panne que dans un nombre restreint de cas.

Il est en outre curieux de réaliser que cet équilibre délicat repose sur le mécanisme plutôt rude de la protéolyse enzymatique. C'est en effet le même principe qui est à la base de la destruction des protéines alimentaires ingérées et de la coagulation du sang !

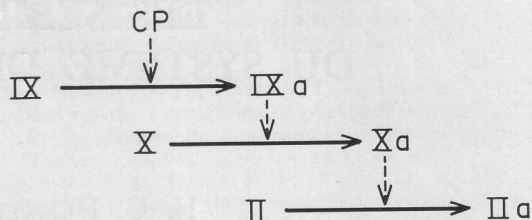
Il serait superflu de développer ici ce que sont les sérine-estérases. Il est toutefois utile d'avoir présent à l'esprit que toute sérine-estérase en coagulation, comme dans l'appareil digestif, provient d'une proenzyme inactive. La proenzyme est transformée en enzyme active par une protéolyse limitée. Suivant la terminologie des coagulationnistes, on dit qu'un facteur est *activé* par un autre facteur.

En premier lieu il s'agit de dépister les sérine-estérases parmi les facteurs de coagulation. Ceci ne peut être effectué d'une façon indiscutable qu'en déterminant l'ordre primaire des résidus amino-acides du site actif de l'enzyme. Pour la thrombine le mérite de cette étude revient à S. Magnusson (9). Pour le facteur Xa ce sera peut-être chose faite dans peu de temps mais pour les autres facteurs cet idéal est encore loin.

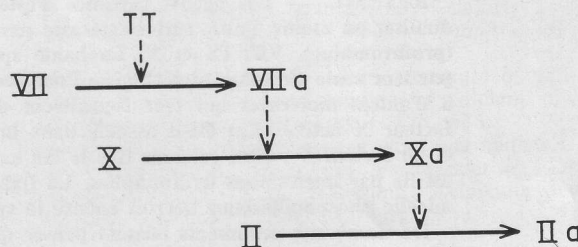
Heureusement on peut suivre une autre voie. Toutes les sérine-estérases connues ont en commun la propriété d'être inhibées par des organophosphates, des carbamates et des sulfonylhalides. L'inhibition est causée par une estérification irréversible de la sérine active. Le mécanisme de cette inhibition est actuellement bien connu, mais cela nous mènerait trop loin d'en discuter ici le détail. Quoique l'estérification de la sérine soit en principe égale pour toute enzyme inhibée, les groupes adjacents de la sérine dans la structure tertiaire influent d'une manière importante sur les conditions de la réaction. Ces groupes varient — ou bien en position ou bien en nature — d'une enzyme à l'autre. Pour cette raison, chaque couple sérine-estérase/inhibiteur est caractérisé par ses propres constantes cinétiques. On peut alors reconnaître les sérine-estérases parmi les facteurs de la coagulation en déterminant leur susceptibilité à l'action inhibitrice des organophosphates et autres inhibiteurs. Il est en outre possible de reconnaître ainsi les inhibiteurs spécifiques d'un facteur donné. Les résultats de telles expériences sont donnés dans le tableau I (2). Evidemment ce sont les facteurs II, VII, IX et X qui sont inhibés tandis que les facteurs V et VIII sont réfractaires aux inhibiteurs. On voit que chaque facteur est susceptible à sa propre gamme d'inhibiteur, indiquant qu'il s'agit de quatre sérine-estérases différentes.

Pour le moment nous ne discuterons pas la nature du « produit de contact » (CP) qui se forme par l'interaction des facteurs XII et XI en présence d'une

surface mouillable et pas d'avantage la nature de la thromboplastine tissulaire (TT). L'épine dorsale de la thrombinoformation intrinsèque peut alors être envisagée comme suit :



La thrombinoformation extrinsèque peut être schématisée de la façon suivante :



On voit ainsi se dégager le principe d'une cascade de réactions enzymatiques ainsi qu'elle a été conçue originellement par MacFarlane (8).

Un tel système global ne rend pas compte de deux caractéristiques qui sont pourtant d'une extrême importance : la spécificité de chaque interaction et le caractère limité de toute thrombinoformation *in vivo*. En général les enzymes ne reconnaissent dans la molécule de substrat qu'un nombre restreint d'atomes. La spécificité obtenue de cette manière est li-

TABLEAU I. — Inhibition des facteurs de coagulation par une série sélectionnée d'inhibiteurs de sérine-estérases.

| N° | Structure | Conc. mol. | Inhibition (%) du facteur | | | | | |
|----|--|--------------------|---------------------------|---|-------|------|------|-----|
| | | | II a | V | VII a | VIII | IX a | X a |
| 1 | p-Cl-Ph-O-C(=O)-NH-Me | 2×10^{-4} | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 |
| 2 | Ph-O-C(=O)-NH-ME | 10^{-3} | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 25 |
| 11 | m(Me ₂ -CH(CH ₃)).Ph-O-C(=O)NHCH ₃ | 2×10^{-4} | 5 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | (pNO ₂ -Ph-O) ₂ -P(=O)-eth | 2×10^{-5} | 95 | 0 | 40 | 0 | 0 | 5 |
| 17 | (pNO ₂ -Ph-O) ₂ -P(=O)-CH ₂ -Ph | 4×10^{-5} | 95 | 0 | 65 | 0 | 5 | 50 |
| 19 | (pNO ₂ -Ph-O) ₂ -P(=O)-NH-CH ₃ | 2×10^{-5} | 60 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 |
| 21 | (Cl-Ph-O) ₂ -P(=O)-NHCH ₃ | 10^{-4} | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 26 | CH ₃ -Ph-O-C(=O)-NHCH ₃ | 2×10^{-4} | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 20 |
| 27 | CH ₃ -Ph-O-C(=O)-NH-Ph | 4×10^{-4} | 30 | 0 | 45 | 0 | 5 | 0 |

mitée à des substrats de dimensions restreintes. Les enzymes capables d'attaquer des grandes molécules, comme la ribonucléase et la trypsine, ne sont pas très spécifiques pour leurs substrats entiers mais pour certaines configurations d'atomes dans ce substrat. C'est ainsi que la trypsine n'attaque généralement une protéine que là où se trouve un résidu arginine ou lysine. L'action d'une seule sérine-estérase ne peut que très difficilement expliquer le degré de spécificité atteint par les facteurs de coagulation. Pour reconnaître son substrat parmi toutes les protéines présentes, un facteur de coagulation actif doit être aidé par un autre facteur qui n'est pas muni d'un centre actif mais qui fournit des sites d'attachement supplémentaires. Ces facteurs auxiliaires sont les facteurs qui ne sont pas inhibés par les organophosphates : le V et le VIII. Le rôle du facteur V comme coopérateur du facteur Xa a été reconnu par Hanahan (10) et nous-mêmes (4) et nous avons décrit un peu plus tard un rôle analogue pour le VIII coopérant avec le IX (5).

Regardons la prothrombinase (fig. 1) : l'enzyme se forme par la juxtaposition des facteurs Xa et V sur la surface d'une micelle de phospholipide. Le facteur Xa est lié par un ion calcium tandis que le facteur V est lié par une interaction hydrophobe. Il est ainsi nécessaire que la surface du phospholipide présente des sites hydrophobes et des sites capables de fixer le calcium, c'est-à-dire des sites chargés. Ceci peut être très bien envisagé. Une micelle de phospholipides typique peut être comparée à un petit ballon d'un diamètre d'environ 250 Å. L'intérieur comme l'extérieur du ballon sont en phase aqueuse. La membrane du ballon consiste en une couche double de molécules de phospholipides. A l'intérieur de cette couche se trouvent des résidus d'acides gras. Les deux surfaces sont formées des résidus ioniques des molécules de phospholipide ; c'est-à-dire des « têtes » hydrophiles (fig. 2). Cependant les têtes des molécules de phospholipide ne sont pas homogènes. La topochimie indique qu'il s'agit d'une structure asymétrique avec des parties plus ou moins chargées — charge

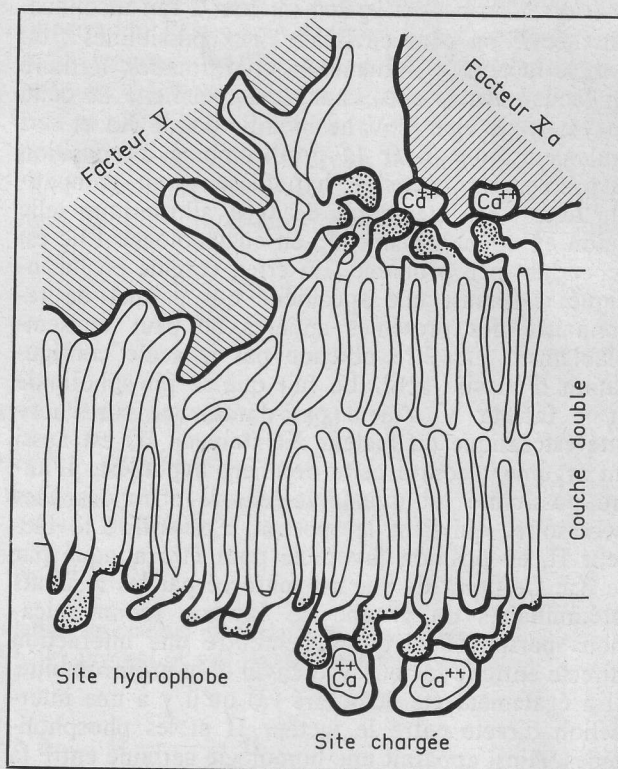


Fig. 2. — Modèle de l'interaction des facteurs Xa et V à la surface d'une micelle de phospholipide.

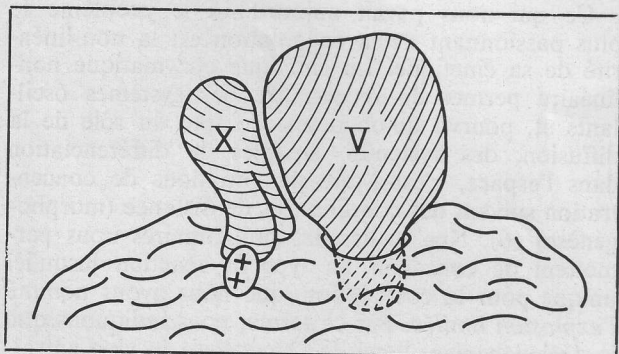


Fig. 1. — Modèle de la prothrombinase.

positive ou négative — et plus ou moins hydrophobes. La surface d'une micelle doit montrer alors une mosaïque de structures supra-moléculaires qui naissent de l'interaction des têtes des molécules de phospholipide. Ainsi on obtient une imbrication de régions susceptibles les unes d'interactions hydrophobes, les autres pouvant être engagées dans des interactions hydrophiles. Les dimensions relatives des têtes déterminent la topographie des sites plus ou moins hydrophobes ou hydrophiles répartis à la surface de la micelle et par conséquent déterminent la possibilité pour les facteurs Xa et V de se placer en position favorable l'un par rapport à l'autre. Parce que la topographie moléculaire et la charge sont fixées ensemble pour chaque type de phospholipide individuel, il est difficile de juger si la constitution optimale de certaines combinaisons de phospholipides en micelles est due à une charge favorable ou à une mosaïque optimale (14).

Une molécule de facteur V a un poids moléculaire d'environ 200 000. En forme globulaire cela indique un diamètre d'environ 80 Å. La molécule n'est alors pas beaucoup plus petite qu'une micelle de phospholipide (250 Å). L'interaction entre les deux doit alors comporter d'importants changements de structure tertiaire. Rien n'est connu à ce sujet. La nature des interactions entre les facteurs V et Xa

une fois adsorbés est également tout à fait inconnue. En théorie on peut envisager deux possibilités : ou bien le facteur V influence la conformation tertiaire du facteur Xa et ainsi change la spécificité de cette enzyme : ou bien le V ne modifie pas le Xa et sert seulement pour fixer la prothrombine en position favorable. La première hypothèse serait compatible avec une interaction de type allostérique telle qu'on en connaît beaucoup en enzymologie. Elle est cependant peu probable. En effet, comme on l'a indiqué ci-dessus, une spécificité qui permet de reconnaître des protéines entières ne peut vraisemblablement pas être obtenue par la seule configuration d'un site actif. Le fait que le phospholipide et le facteur V n'aient pas d'influence sur l'activité estérasique du facteur Xa (tableau II) est aussi un argument contre cette première hypothèse. L'autre possibilité est que le facteur V offre des sites accessoires qui lient le substrat, c'est-à-dire le facteur II, en position favorable pour être attaqué par le Xa. Ce point de vue est renforcé par les résultats préliminaires du groupe de Jackson (communications personnelles) qui a démontré une interaction directe entre le facteur V (activé) et la prothrombine. Il a également été démontré (3) qu'il y a une interaction directe entre le facteur II et les phospholipides. Ainsi apparaît une homologie certaine entre la partie du facteur Xa qui se lie au phospholipide et une certaine région de la molécule de prothrombine. Le facteur II semble alors interagir avec tous les constituants du complexe Xa-V-phospholipide (fig. 3).

Beaucoup moins de choses sont connues sur le complexe formé par les facteurs VIII et IXa qui active le facteur X. Pour le peu que l'on connaisse la situation paraît tout à fait analogue à celle de la

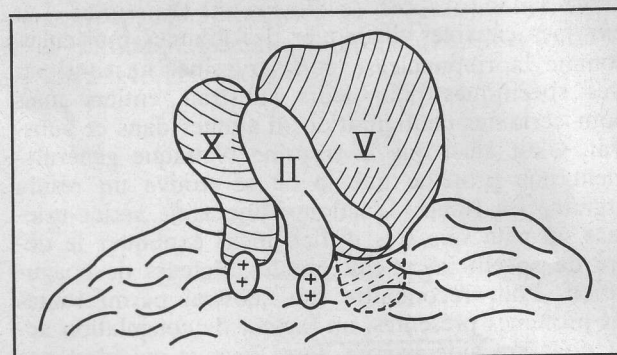


Fig. 3. — Modèle du complexe prothrombine-prothrombinase.

prothrombinase mais les données exactes sont presque totalement absentes.

Avec la discussion de la nature du « produit de contact », on est encore sur terre moins ferme. Schoenmakers (12) a très bien démontré que le XII est une estérase qui est rendue active par les déformations de sa structure tertiaire causées par son adsorption sur une surface mouillable. Mais les preuves apportées par Kingdon et al. (11) en faveur du fait que le facteur XI serait une sérine-estérase ne sont pas tout à fait convaincantes.

Les diverses actions du « produit de contact » sont très intéressantes. Il a été notamment rapporté que ce produit non seulement active le IX mais aussi le VII, court-circuitant le système intrinsèque de la coagulation : ainsi la thrombine peut-elle se former en l'absence du facteur VIII et le paradoxe de Rapaport (11) est résolu, qui dit que la thrombine est nécessaire à l'activation du facteur VIII (1). En outre le « produit de contact » active le kalikreinogène (15) et le système fibrinolytique (15). Pourtant les malades qui ont un déficit en facteur XII ne sont pas atteints d'affections suggérant une déficience du système de fibrinolyse ou de kalikréine. Bien plus la présence d'un système générant un produit de contact actif ne paraît pas indispensable à une hémostase normale !

Ce qui nous paraît aujourd'hui le problème le plus passionnant de la coagulation est la non-linéarité de sa cinétique. La cinétique enzymatique non-linéaire permet de reconnaître des systèmes oscillants et, pourvu qu'on tienne compte du rôle de la diffusion, des systèmes capables de différenciation dans l'espace, c'est-à-dire de variations de concentration suivant des coordonnées de distance (morphogénèse) (6). Nos recherches préliminaires nous permettent de concevoir un type de réaction jusqu'ici unique pour la coagulation, que nous avons nommé *l'explosion limitée*. Par ce terme, nous indiquons que le déclenchement local de l'hémostase *in vivo* entraîne une coagulation explosive et inévitable mais seu-

TABLEAU II. — Influence du facteur V, des ions calcium et des phospholipides sur l'activité TAME-estérasique du facteur Xa, à 37°C, pH 8.0 dans 0.01 M TAME (1 unité de vélocité = 44 μ M/h).

| Unités | μ M Ca++ | Unités V | μ g/ml phospholipides | Vélocité relative |
|--------|--------------|----------|---------------------------|-------------------|
| 250 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.0 |
| 250 | 0.17 | 0.0 | 0.0 | 0.7 |
| 250 | 0.17 | 4.0 | 0.0 | 0.65 |
| 250 | 0.17 | 4.0 | 7.5 | 0.6 |
| 250 | 0.17 | 24.0 | 7.5 | 0.3 |
| 250 | 0.17 | 24.0 | 15.0 | 0.2 |
| 375 | 0.17 | 24.0 | 22.5 | 0.5 |
| 375 | 1.0 | 24.0 | 22.5 | 0.45 |
| 500 | 1.0 | 24.0 | 22.5 | 0.8 |
| 500 | 1.0 | 24.0 | 30.0 | 0.8 |
| 625 | 1.0 | 24.0 | 37.5 | 1.8 |

lement jusqu'à une distance finie de la plaie. Ainsi peut-on expliquer que toute hémostasie ne soit pas suivie d'une thrombose léthale (*).

(*) Cette conception de l'hémostasie ne se limite pas à la coagulation *strictu sensu*. Quand on veut y inclure la part tenue par les plaquettes il suffit de reconnaître que le rôle autocatalytique de l'ADP dans l'agrégation des plaquettes est parallèle au rôle autocatalytique de la thrombine dans la coagulation.

Pour comprendre et calculer la cinétique non-linéaire de l'explosion limitée, il est nécessaire de tenir compte du rôle auto-catalytique de certains produits générés pendant la coagulation et de la part tenue par les inhibiteurs physiologiques. L'important est de concevoir que la cinétique enzymatique n'est pas impuissante à résoudre les problèmes les plus importants posés par la coagulation.

THE SERINE-ESTERASES OF THE COAGULATION SYSTEM

by H. C. HEMKER and J. S. de GRAAF

Laboratoire de Cardiobiochimie et de Biochimie de la coagulation sanguine
Hôpital Universitaire, Leyden (Pays-Bas)

(Path.-Biol., 1973, 21, Suppl., 5-10)

SUMMARY. — The backbone of the coagulation mechanism is a chain of proenzyme-enzyme conversions arranged in a « cascade », i.e. the product of one reaction is the enzyme in the next. This chain is :



The roman numeral denote the coagulation factors in their proenzyme form, the subscript a denotes the enzymatically active form. By means of specific inhibition it could be demonstrated that the factors II_a , VII_a , IX_a , and X_a do not function as such but as a part of a complex consisting of the serine esterase and a not enzymatically active protein (the « paraenzyme ») absorbed side by side at a phospholipid-water interphase. The paraenzyme partner of factor IX_a is factor VIII; factor X_a complexes with factor V.

In the case of the latter two factors, it could be shown that the arrangement in a complex does not enhance the reactivity of the esterase towards small substrates whereas it markedly increases the reactivity towards prothrombin. The function of the paraenzyme presumably is to offer additional binding sites to the natural substrate. Binding of the enzyme to the interphase is via Ca^{++} -ions, hence via a hydrophobic site, whereas the paraenzyme is bound hydrophobically. This implies the necessity of both hydrophylic and hydrophobic regions being available at the phospholipid surface, in a more or less regular arrangement (mosaic pattern). The conformation of this pattern may determine the thromboplastic activity of a given phospholipid.

Key-words : Blood clotting factors. — Prothrombinase. — Serine-esterases. — Enzyme kinetics.

RÉFÉRENCES

1. ALTMAN R., HEMKER H. C., 1967. — Contact activation in the extrinsic blood clotting system. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* (Stuttg.), 18, 525.
2. DE LANGE J. A., HEMKER H. C., 1972. — Inhibition of blood coagulation factors by serine-esterase inhibitors. *FEBS Letters*, 24, 265.
3. HANAHAN P. J., BARTON P. G., COX A., 1969. — The interactions of prothrombin and factors V and X with phospholipids and calcium ions. In HEMKER H.C., LOELIGER E. A., VELTKAMP J. J. — *Human Blood Coagulation*. Leiden University Press, p. 24.
4. HEMKER H. C., ESNOUF M. P., HEMKER P. W., SWART A. C. W., MACFARLANE R. G., 1967. — Formation of prothrombin converting activity. *Nature*, 215, 248.
5. HEMKER H. C., KAHN M. J. P., 1967. — Reaction sequence of blood coagulation. *Nature*, 215, 1201.
6. HERMENS W. T., HEMKER P. W., HEMKER H. C., 1972. — On the theory of the generation of stable inhomogeneous states in homogeneous mixtures. In HEMKER H. C., HESS B. — *Analysis and stimulation of biochemical systems*, North Holland, American Elsevier, Amsterdam, p. 19.
7. KINDON H. S., DAVIE E. W., 1965. — Further studies on the activation of factor IX by activated factor XI. In KOLLER F., STREULI F. — *Genetics and the interaction of blood clotting factors*, Schattauer Verlag, Stuttgart, p. 15.
8. MACFARLANE R. G., 1964. — An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, 202, 498.
9. MAGNUSSON S., 1970. — Structure and function and prothrombin. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* (Stuttg.), suppl. 38, 97.
10. PAPAHDJOPOULOS D., HANAHAN P. J., 1964. — Observations on the interactions of phospholipids and certain clotting factors in prothrombin activator formation. *Biochim. biophys. Acta* (Amst.), 90, 436.
11. RAPAPORT S. I., HJORT P. F., PATCH M. J., 1965. — Further evidence that thrombin-activation of factor VIII is an essential step in intrinsic clotting. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 17 (suppl. 84), 88.
12. SCHOENMAKERS J. G., KURSTJENS R. M., HAANEN C., ZILLIKEN F., 1963. — Purification of activated bovine Hageman factor. *Thrombos. Diathes. haemorrh.* (Stuttg.), 9, p. 546.
13. SCHOENMAKERS J. G., MATZE R., HAANEN C., ZILLIKEN F., 1965. — Hageman factor, a novel sialoglycoprotein with esterase activity. *Biochim. biophys. Acta* (Amst.), 101, p. 166.
14. SEIMIYA T., OHKI S., 1973. — Ionic structure of phospholipid membranes, and binding of calcium ions. *Biochim. biophys. Acta* (Amst.), 298, 546.
15. TEMME H., 1970. — Aktivierung von Gerinnungs- und Kininsystem durch ein Plasmaesterase. Der Hageman-Faktor (XII). Isolierung, Reinigung und Charakterisierung. *Thesis*, Marburg/Lahn.